



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication : **0 661 279 A1**

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑳ Numéro de dépôt : **94403038.6**

⑤① Int. Cl.⁶ : **C07D 257/02, C07C 229/16,
A61K 49/00, C07H 15/26**

㉔ Date de dépôt : **27.12.94**

③① Priorité : **30.12.93 FR 9315933**

④③ Date de publication de la demande :
05.07.95 Bulletin 95/27

⑧④ Etats contractants désignés :
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE**

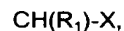
⑦① Demandeur : **GUERBET S.A.**
15, rue des Vanesses
F-93430 Villepinte (FR)

⑦② Inventeur : **Meyer, Dominique**
6 rue de Metz
F-94100 Saint-Maur (FR)
Inventeur : **Rousseaux, Olivier**
13 Avenue du Val d'Aunette
F-60300 Senlis (FR)
Inventeur : **Schaeffer, Michel**
17 Avenue J.B. Leprince
F-77400 Lagny (FR)
Inventeur : **Simonot, Christian**
43 Rue Alphonse Penaud
F-75020 Paris (FR)

⑦④ Mandataire : **Le Guen, Gérard et al**
CABINET LAVOIX
2, place d'Estienne d'Orves
F-75441 Paris Cédex 09 (FR)

⑤④ **Ligands polyaminés, complexes métalliques, procédé de préparation, applications diagnostiques et thérapeutiques.**

⑤⑦ L'invention a pour objet des dérivés de poly(aminoacides), chélateurs d'ions métalliques paramagnétiques dont au moins 3 des atomes d'azote donneurs portent des substituants, identiques ou différents, de formule



dans laquelle X représente CO_2R_a , CONR_bR_c ou $\text{P}(\text{R}_d)\text{O}_2\text{H}$ et R_a , R_b , R_c identiques ou différents représentent H ou $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$, éventuellement hydroxylé ; R_d représente OH, $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$ ou $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkoxy}$; et R_1 représente un groupe hydrophile de masse moléculaire supérieure à 200, comportant au moins 3 atomes d'oxygène étant entendu qu'au moins 3 des groupes X sont des fonctions acides, éventuellement salifiées.

EP 0 661 279 A1

L'invention concerne des dérivés de poly(aminoacides) pouvant former des chélates avec les cations métalliques paramagnétiques, ainsi que ces chélates, les procédés de préparation de ces composés et les compositions pour l'imagerie médicale qui contiennent ces chélates.

En effet, ces complexes métalliques modifient les temps de relaxation des protons, excités par une radiofréquence, dans un champ magnétique, et sont particulièrement utiles comme agents de contraste *in vivo* pour améliorer les images des organes cibles obtenues par résonance magnétique nucléaire.

Les complexes de gadolinium, utilisés en clinique humaine, correspondent à une relaxivité spin-réseau, ou longitudinale, R_1 comprise entre 3 et 5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans l'eau, à 37°C pour 20 MHz.

Afin d'améliorer la qualité des images, on assiste actuellement à une augmentation des doses, par exemple 0,3 mmole/kg de poids corporel au lieu de 0,1 mmole/kg pour les complexes classiques comportant un seul ion Gd par molécule, augmentation qui peut s'accompagner d'un accroissement des effets secondaires, notamment ceux dus à l'osmolalité des complexes.

Il serait évidemment préférable d'augmenter l'intensité du signal mesuré en augmentant la relaxivité R_1 de l'agent de contraste.

On sait que R_1 est augmenté sensiblement lorsque le chélate métallique est greffé sur une macromolécule d'origine biologique ou non, tel que dextran, albumine ou polylysine; néanmoins si la relaxivité R_1 par atome de gadolinium augmente, le rapport de R_1 à la masse moléculaire du complexe conjugué, dit relaxivité massique, diminue de telle sorte que le poids d'une dose diagnostique augmente, ainsi que son coût.

Les complexes de gadolinium de l'invention donnent des relaxivités R_1 supérieures à celles des complexes connus de masses moléculaires analogues; il est vraisemblable mais on ne saurait être limité par cette explication, que l'introduction d'au moins 3 bras latéraux hydrophiles sur les groupes acides, substituants les atomes d'azote donneurs des ligands connus, diminue sensiblement la liberté de mouvement du complexe paramagnétique et de l'ion paramagnétique qui y est attaché, dont la rotation dans le champ magnétique est ainsi restreinte.

La présence de bras latéraux a parfois été envisagée dans certaines demandes de brevet, telles que EP-A-299795, EP-A-481420 et WO 89/05802, mais seulement à titre de généralisation de formules, exemplifiées uniquement par des molécules dont les ramifications sont courtes, plus ou moins hydrophobes et situées sur deux des azotes au plus, de telle sorte qu'aucun effet favorable ne pouvait être observé sur la relaxivité massique et n'a, évidemment, été envisagé.

Par un choix correct des bras latéraux, caractéristiques de l'invention, on peut, et c'est un autre avantage, non seulement améliorer la relaxivité du complexe mais aussi agir sur sa biodistribution, par exemple en introduisant dans ces bras des fragments spécifiques de certains récepteurs biologiques ou encore en utilisant des bras de dimension telle que le volume moléculaire du complexe soit suffisant pour diminuer sa perméabilité vasculaire et qu'il séjourne dans cette zone plus longtemps que les agents de contraste actuels.

Selon un premier aspect, l'invention concerne des composés de type poly(aminoacides), qui peuvent former des chélates avec les ions métalliques paramagnétiques, caractérisés en ce qu'au moins 3 des atomes d'azote donneurs, à savoir ceux qui formeront des liaisons de coordination avec l'ion métallique, portent des substituants, identiques ou différents, de formule $\text{CH}(\text{R}_1)\text{-X}$, dans laquelle X représente CO_2R_a , CONR_bR_c ou $\text{P}(\text{R}_d)\text{O}_2\text{H}$ et R_a , R_b , R_c représentent indépendamment H ou $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$, éventuellement hydroxylé, et R_d représente OH, $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$ ou $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkoxy}$.

et R_1 représente un groupe hydrophile de masse moléculaire supérieure à 200, comportant au moins 3 atomes d'oxygène,

étant entendu qu'au moins 3 des groupes X sont des fonctions acides, éventuellement salifiées.

R_1 peut comporter des atomes d'azote, mais aucun ne saurait être un atome donneur du chélate, c'est-à-dire former une liaison de coordination avec l'ion métallique.

La plupart des ligands connus pour complexer les cations paramagnétiques tels que Fe^{3+} , Mn^{2+} , Gd^{3+} , Dy^{3+} , ou même les éléments radioactifs comme l'yttrium ou le technétium comportent au moins 3 atomes d'azote substitués par un groupe acétique, méthylénephosphonique ou phosphorique, mais les molécules de la présente invention s'en différencient par la présence sur ces 3 substituants d'un bras latéral fonctionnalisé hydrophile. Ces bras, ou ramifications, peuvent être de nature très diverse mais ils doivent présenter suffisamment d'encombrement et comporter des atomes susceptibles de former *in vivo* avec le milieu environnant des liaisons de telle sorte que ces interactions moléculaires immobilisent la molécule dans le milieu par au moins 3 points.

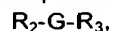
Ainsi, le remplacement dans les molécules connues pour complexer des ions métalliques paramagnétiques, des substituants d'au moins 2 des atomes d'azote donneurs par 3, ou mieux 4 groupes $\text{CH}(\text{R}_1)\text{-X}$ conformes à l'invention, de préférence identiques, permet d'obtenir des composés selon l'invention.

On peut notamment citer parmi ces molécules connues, celles décrites dans EP-A-232 751, EP-A-255 471, EP-A-287 465, EP-A-365 412, EP-A-391 766, EP-A-438 206, EP-A-484 989, EP-A-499 501, WO-89/01476,

WO-89/10645, et WO-91/11475 ainsi que le ligand du gadopentate et celui du gadotérate.

Parmi les groupes R_1 convenables, certains ne comportent que des atomes de C, H et O; ce sont notamment des poly[oxy(C_2 - C_3)alkylène], des polyhydroxyalkyles ou les restes d'oligosaccharides ou de polysaccharides, monofonctionnalisés pour permettre leur fixation sur le carbone en alpha de X.

5 R_1 peut aussi représenter des groupes plus complexes et notamment



dans lequel

R_2 représente rien, alkylène, alkoxyalkylène, polyalkoxyalkylène, alkylène interrompu par phénylène, phénylène ou un reste hétérocyclique saturé ou non,

10 G représente une fonction O, CO, OCO, COO, SO₃, OSO₂, CONR', NR'CO, NR'COO, OCONR', NR', NR'CS, CSNR', SO₂NR', NR'SO₂, NR'CSO, OCSNR', NR'CSNR', P(O)(OH)NR', NR'P(O)-(OH) dans laquelle R' est H, (C_1 - C_8)alkyle ou R_3

R_3 représente alkyle, phényle, alkyle substitué ou interrompu par un ou des groupes choisis parmi phényle, alkylèneoxy, amino ou amido substitués ou non par alkyle éventuellement substitué ou interrompu par l'un
15 des groupes précédents ou R_3 est le reste d'un composé, éventuellement monofonctionnalisé, choisi parmi les saccharides, les oligosaccharides, les peptides, les macromolécules naturelles ou synthétiques biocompatibles ou les molécules susceptibles de se lier à un biorécepteur endogène,

ainsi que les sels de ces composés avec des acides ou des bases physiologiquement acceptables.

On préfère les composés dans lesquels G est un groupe amido : CONR' ou NR'CO, R' étant H, (C_1 - C_8)alkyle ou R_3 , ou est l'atome d'oxygène, formant avec R_2 et R_3 une fonction éther-oxyde ainsi que ceux dans lesquels
20 X est CO₂H.

Parmi ceux-ci, les composés dans lesquels les R_1 , identiques ou différents, représentent R_2 -G- R_3 sont particulièrement préférés lorsque R_2 représente (C_0 - C_6)alkylène, éventuellement interrompu par phénylène et
25 R_3 représente (C_1 - C_{14})alkyle éventuellement substitué ou interrompu par un ou des groupes choisis parmi phényle, (C_1 - C_6)alkoxy, amino et amido substitués ou non par alkyle ou alkoxyalkyle, les saccharides, les oligosaccharides et les macromolécules biocompatibles telles que polyéthylène glycol et ses éthers en C_1 - C_2 et dextran.

Comme R_2 préféré, on peut citer (CH₂)_n, CH₂CHOH, CH₂CHOHCH₂, (CH₂)₄CHOH, (CH₂)_nC₆H₄ ou C₆H₄ avec n = 1, 2, 3.

30 Dans l'ensemble de la présente description, sauf mention contraire, on entend par poly[oxy(C_2 - C_3)alkylène], les polyoxyéthylènes et polyoxypropylènes notamment le polyéthylène glycol et ses monoéthers et monoesters en C_1 à C_3 , de masse moléculaire inférieure à 150 000; par saccharides, on entend les hydrates de carbone, tel que mannose, fucose, galactose et les aminosaccharides tel que glucosamine ou galactosamine; par oligosaccharide, on entend les enchaînements linéaires ou cycliques de 2 à 10 unités saccharidiques,
35 tel que le saccharose, le maltotriose et les cyclodextrines; par polysaccharides, on entend notamment les dérivés de la cellulose, ou l'hydroxyéthylamidon, l'inuline ou les dextrans de masse moléculaire inférieure à 20 000 ou même supérieure pour les complexes insolubles dans l'eau; par poly(hydroxyalkyle) on entend les polyols de masse moléculaire inférieure à 20 000 et notamment l'alcool polyvinylique.

Les groupes alkyles, alkylènes, alkoxy sont sauf mention contraire en C_1 à C_{14} , linéaires, ramifiés ou cycliques; ces groupes peuvent être hydroxylés sur un ou plusieurs carbones.

Les groupes phényles, phénylènes et hétérocycliques peuvent être substitués par OH, Cl, Br, I, (C_1 - C_8)alkyle, (C_1 - C_8)alkoxy, NO₂, NR_xR_y, NR_xCOR_y, CONR_xR_y, COOR_x, R_x et R_y étant H ou (C_1 - C_8)alkyle.

Parmi les groupes hétérocycliques, aromatiques, insaturés ou acycliques, on peut citer ceux dérivés du thiophène, furanne, pyranne, pyrrole, pyrrolidine, morpholine, piperazine, imidazole, pyridine, pyrimidine, pyrazine, pyridazine, thiazole, oxazole, pyrrolidine, imidazoline, dioxanne, tétrazole, benzofuranne, indole, quinoline et isomères ou dérivés plus ou moins saturés.

Parmi les macromolécules naturelles ou synthétiques biocompatibles on peut citer les polyoxy(C_2 - C_3)alkylène ou polyéthers, les polysaccharides, les polyaminoacides, comme la polylysine, les protéines comme l'albumine ou les anticorps et leurs fragments, les glycoprotéines ainsi que les oligomères ou polymères en étoile
50 comme les dendrimères et les arborols décrits dans Angew. Chemie, Int. Ed. 29(2) 138-175, 1990 et EP-A-115 771.

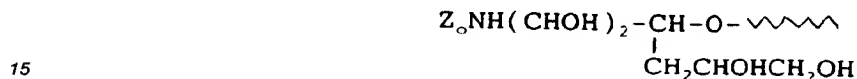
On peut aussi, notamment lorsque les chélates sont destinés à être administrés à l'homme par voie orale ou rectale, utiliser des macromolécules insolubles ou peu solubles dans l'eau, telles que les dérivés des acides polyméthacryliques ou la polyvinylpyrrolidone.

55 Parmi les molécules susceptibles de se lier à un biorécepteur endogène, et permettant donc de concentrer le chélate dans un organe ou une partie de celui-ci on peut citer celles mentionnées dans US-4 647 447 et notamment les hormones comme l'insuline, les prostaglandines, les stéroïdes, les anticorps, notamment ceux spécifiques des cellules tumorales, les lipides ou certains sucres comme l'arabinogalactan ou le glucose, des

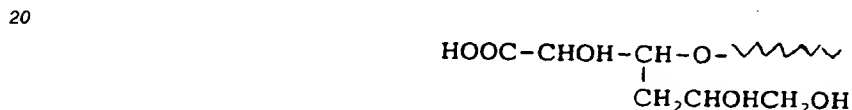
glycoprotéines sans acide sialique terminal connus pour leur fixation hépatique.

Par ailleurs, la présence d'une zone hydrophobe sur R₁, et notamment celle d'un noyau phényle, peut favoriser ainsi la formation de liaisons non-covalentes avec les protéines biologiques et notamment avec l'albumine; cette zone hydrophobe peut aussi se trouver greffée sur une autre partie du poly(aminoacide).

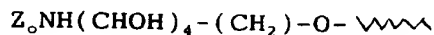
5 Par (poly)saccharide monofonctionnalisé, on entend un (poly)saccharide dont l'une des unités saccharidiques à l'extrémité de la chaîne a été modifiée pour permettre la formation de la liaison G-R₃ ou CH-R₁; ce type de fonctionnalisation décrit notamment dans J. Polymer. Sc. Part A Polymer chemistry 23 1395-1405 (1985) et 29, 1271-1279 (1991) et dans Bioconjugate chem. 3, 154-159 (1992) est effectué par amination réductrice avec NH₃ ou une amine comportant un groupe réactif ou précurseur d'un groupe réactif ou par oxydation pour donner une lactone. On peut ainsi obtenir un dérivé ayant comme fonction terminale une amine
10 primaire ou un dérivé portant un groupe réactif, comme



avec Z_o = H, H₂N(CH₂)_n, O₂NC₆H₄CH₂
ou un dérivé comportant une fonction acide

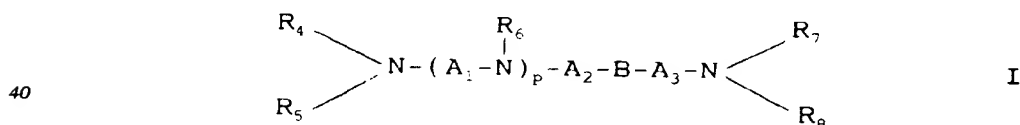


25 à partir du maltose
tandis que pour le dextran, on obtiendra



30 Par polyéthylèneglycol monofonctionnalisé ou par éther de polyéthylène glycol monofonctionnalisé, on entend le composé dont l'une des extrémités porte une fonction réactive, telle que celles décrites dans JMS Res. Macromol. Chem. Phys. C. 25(3) 325-373 (1985); on peut aussi se référer à J. Org. Chem. 45, 5364 (1980) pour la préparation d'un aminopolyéthylène-glycol ou à Makromol. Chem. 182, 1379-1384 (1981) pour différentes méthodes de substitution.

35 Un groupe préféré de ligands de l'invention est de formule



dans laquelle

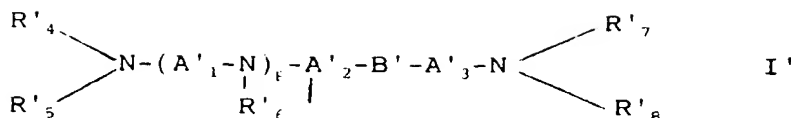
- A₁, A₂, A₃, indépendamment l'un de l'autre, représentent



50 m et n étant des nombres entiers, identiques ou différents, compris entre 0 et 5 dont la somme vaut 1 à 5.

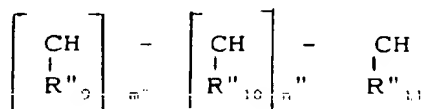
R₉, R₁₀, R₁₁ représentent, indépendamment H, alkyle, alkoxyalkyle, phényle, alkylènephényle, R₁₀ pouvant représenter en outre OH ou alkoxy

55 ou l'un des R₉ et R₁₁ parmi A₁, A₂, A₃ représente la formule



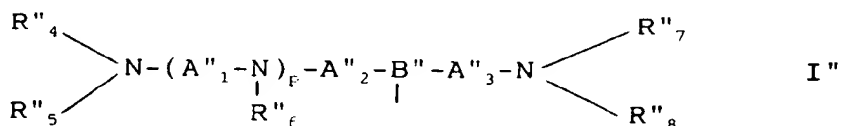
dans laquelle les lettres peuvent avoir les significations des lettres de même indice de la formule I, à l'exclusion de l'un des R'_9 et R'_{11} qui représente (C_1-C_8) alkylène, éventuellement substitué par un ou des (C_1-C_8) alkoxy, l'autre n'étant pas l';

- p est un nombre entier de 0 à 5;
- R_4 , R_5 , R_6 , R_7 et R_8 représentent, indépendamment, H, alkyle, alkoxyalkyle, amidoalkyle substitué ou non par alkyle ou alkoxyalkyle ou $CH(R_{12})X$, R_{12} étant H, alkyle, alkoxyalkyle ou R_1 , ou les groupes R_4 et R_7 sont liés, et pris ensemble représentent



R''_9 , R''_{10} , R''_{11} , m et n pouvant avoir les significations des lettres de même indice dans la formule I;

- B est O ou N-W et W représente comme R_5 ou polyoxy(C_2-C_3)alkylène, (C_1-C_6) alkylène-Y ou Y, Y étant un hétérocycle saturé ou non de 1 ou 2 cycles accolés, éventuellement substitué par un ou plusieurs OH, alkyle, alkoxy, alkoxyalkyle, ayant jusqu'à 12 sommets, comportant 1 à 4 hétéroatomes choisis parmi O, N, S, étant entendu que lorsque W représente Y, le carbone lié à N est lié à 2 atomes de carbone de l'hétérocycle, ou W représente la formule



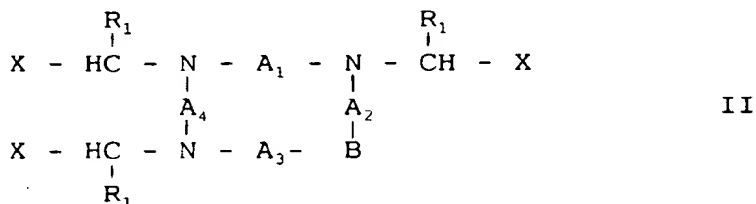
dans laquelle les lettres peuvent avoir les significations des lettres de même indice dans la formule I à l'exclusion de R''_9 et R''_{11} qui ne peuvent représenter l' et de B'' qui représente N-Q, Q étant (C_1-C_8) alkylène, éventuellement substitué par un ou des alkoxy,

- ou A_2-B-A_3 représente un groupe hétérocyclique dans lequel B est un hétérocycle saturé ou non, de 5 ou 6 sommets comportant 1 ou 2 hétéroatomes choisis parmi O, S, N et A_2 et A_3 représentent un groupe $CH-R_6$ dans lequel R_6 est H ou (C_1-C_6) alkyle,

étant entendu qu'au moins 3 groupes parmi R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 et W représentent $CH(R_1)X$.

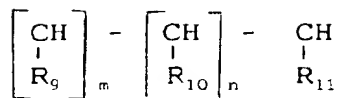
Notamment pour complexer les ions lanthanides, on préfère les composés de formule I qui comportent 3 atomes d'azote différents substitués par au moins un groupe $CH(R_1)X$, et mieux par des $CH(R_1)X$ identiques avec $X = CO_2H$.

Un premier ensemble de ligands préférés parmi ceux de formule I est constitué des macrocycles de formule

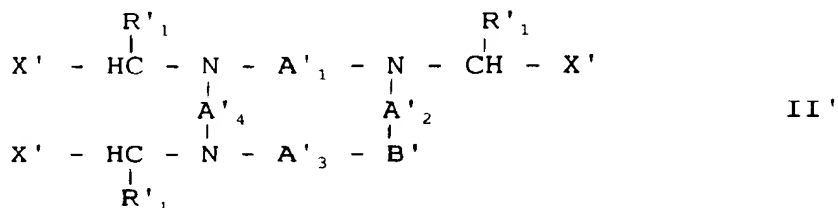


dans laquelle

- les groupes R_1 sont de préférence identiques, et les X représentent de préférence CO_2H ,
- A_1 à A_4 représentent indépendamment



m et n étant des entiers de 0 à 2 dont la somme vaut 1 ou 2 et R₉, R₁₀ et R₁₁ représentent indépendamment H, alkyle, alkoxyalkyle, phényle, alkylène-phényle, R₁₀ pouvant représenter aussi OH ou alkoxy ou l'un des R₉ et R₁₁ représente la formule



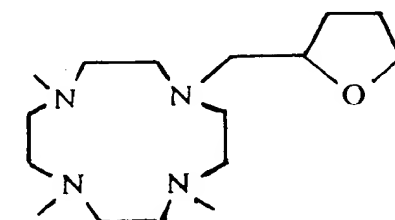
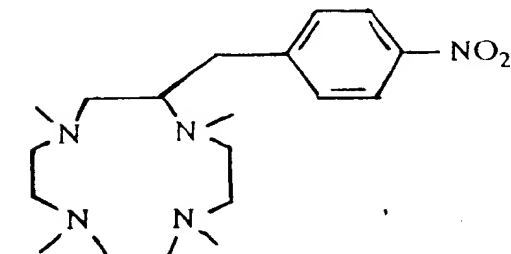
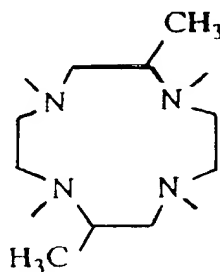
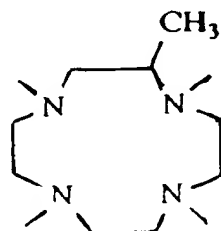
dans laquelle les lettres peuvent avoir les significations des lettres de même indice de la formule II, à l'exclusion de R'₉ ou R'₁₁ qui est lié au macrocycle II et représente (C₁-C₈)alkylène, éventuellement substitué par alkoxy,

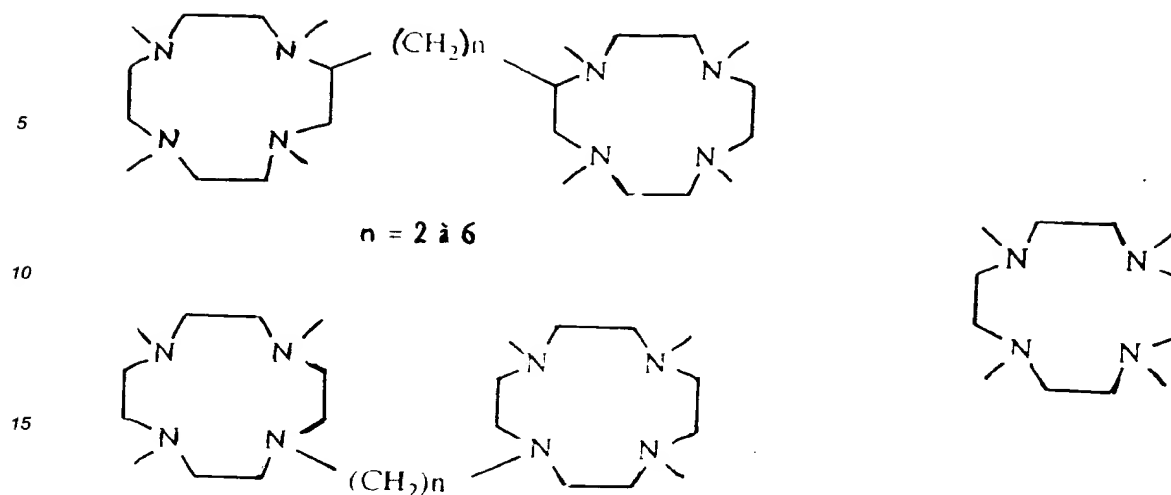
- B représente N-W et W représente comme R₅ ou H, alkyle, alkoxyalkyle, amidoalkylène éventuellement substitué, polyoxy (C₂-C₃)alkylène, ces groupes comportant éventuellement un phényle, (C₁-C₆)alkylène-Y ou Y, Y étant un hétérocycle saturé ou non, de 1 ou 2 cycles accolés, éventuellement substitué par un ou plusieurs OH, alkyle, alkoxy, alkoxyalkyle, ayant jusqu'à 12 sommets, comportant 1 à 4 hétéroatomes choisis parmi O, N, S étant entendu que lorsque W représente Y, le carbone lié à N est lié à 2 atomes de carbone de l'hétérocycle,

ou W représente la formule II' lorsque R₉ et R₁₁ en diffèrent, dans laquelle les lettres peuvent voir les significations des lettres de même indice de la formule II à l'exclusion de B' qui représente N-(C₁-C₈)alkylène, éventuellement substitué par alkoxy, ou encore W représente CH(R₁)X, ou A₂-B-A₃ représente un groupe hétérocyclique dans lequel B est un hétérocycle saturé ou non, de 5 ou 6 sommets comportant 1 ou 2 hétéroatomes choisis parmi O, S, N et A₂ et A₃ représentent un groupe CH-R₆ dans lequel R₆ est H ou (C₁-C₆)alkyle.

On préfère les macrocycles dans lesquels A₁ à A₄ représentent (CH₂)₂ ou (CH₂)₃ ou l'un d'eux est substitué par R₁₁, R₁₁ représentant alkyle, phényle ou alkylène-phényle, de préférence benzyle, éventuellement substitué et mieux ceux dans lesquels B est N-W.

A titre d'exemple de tels macrocycles, on peut citer

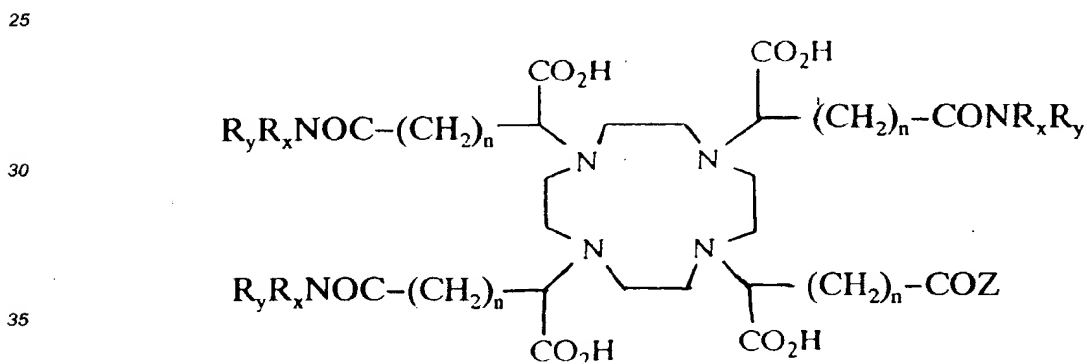




20 qui sont notamment décrits dans les références précédemment citées.

Dans le cas où un atome de carbone du macrocycle est substitué, on préfère notamment pour ne pas obtenir de mélange d'isomères, que les 4 atomes d'azote soient substitués par le même groupe $\text{CH}(\text{R}_1)\text{COOH}$.

Parmi les dérivés du 1, 4, 7, 10-tétraazacyclododécane, on préfère ceux de formule

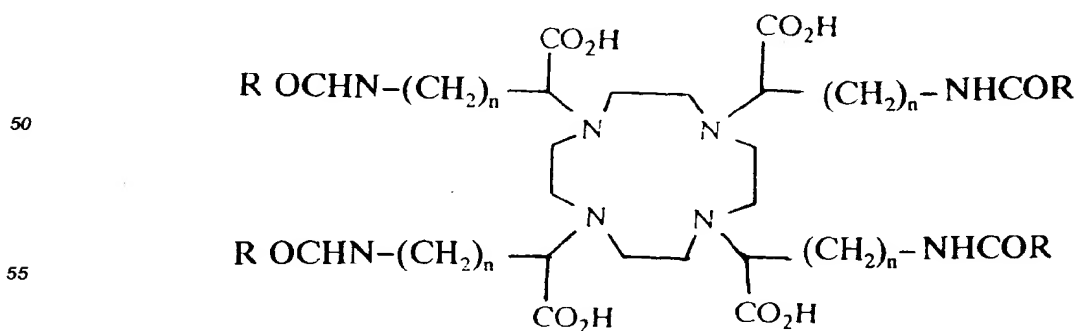


dans laquelle n est 2 ou 3 et

40 R_x est H, $(\text{C}_1\text{-C}_{14})$ alkyle éventuellement hydroxylé, et R_y est $(\text{C}_2\text{-C}_{14})$ alkyle hydroxylé, polyoxy $(\text{C}_2\text{-C}_3)$ alkylène, polyhydroxyalkyle ou le reste d'un saccharide, d'un oligosaccharide ou d'un polysaccharide éventuellement monofonctionnalisés; R_y peut comprendre aussi éventuellement des groupes $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alkylène ou phénylène

liés aux précédents par des fonctions amides ou éther-oxydes, et Z représente $\text{NR}_x \text{R}_y$ ou OH.

Parmi les dérivés de formule II, on peut citer aussi ceux de formule

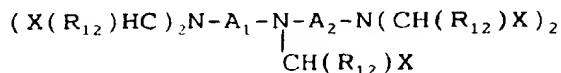


dans laquelle n est 2 ou 3

et R représente (C₂-C₁₄)alkyle hydroxylé;

polyoxy (C₂-C₃)alkylène ou un reste de saccharide, d'oligosaccharide ou de polysaccharide, éventuellement monofonctionnalisés.

5 Un autre ensemble de ligands préférés est celui des dérivés linéaires de formule

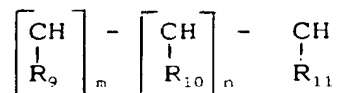


10

dans laquelle

- A₁ et A₂ représentent indépendamment

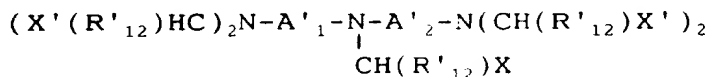
15



20

m et n étant 0, 1 ou 2 et leur somme valant 1 ou 2, R₉, R₁₀, R₁₁ représentant indépendamment H, alkyle, alkoxyalkyle, phényle, alkylénephényle, R₁₀ pouvant représenter aussi OH ou alkoxy ou l'un des R₉ et R₁₁ représente la formule

25



III'

30

dans laquelle les lettres peuvent avoir les significations des lettres de même indice de la formule III à l'exclusion de R'₉ et R'₁₁ qui ne peuvent représenter III' et dont l'un représente (C₁-C₈)alkylène portant éventuellement un ou des alkoxy,

- R₁₂ représente H, alkyle, alkoxyalkyle ou R₁, étant entendu qu'au moins 3CH(R₁₂)X représentent CH(R₁)X, et de préférence sont identiques avec X étant CO₂H.

35

Selon un second aspect, l'invention concerne les complexes paramagnétiques formés entre les ligands de l'invention et les ions métalliques paramagnétiques convenables, tels que ceux du gadolinium, du dysprosium du manganèse, ainsi que les compositions d'agents de contraste pour l'imagerie médicale par résonance magnétique nucléaire qui comprennent ces complexes, associés aux véhicules et additifs usuels.

Les ligands selon l'invention peuvent aussi former des complexes avec des radioéléments comme ^{99m}Tc ou ⁹⁰Y, qui peuvent être utilisés pour établir un diagnostic ou effectuer un traitement thérapeutique.

40

Ces complexes se présentent, en général, sous forme de sel interne, résultat de la neutralisation par le cation métallique central de groupes acides du ligand; lorsque le complexe comprend d'autres groupes acides ceux-ci peuvent être salifiés par une base minérale ou organique pharmaceutiquement acceptable y compris les aminoacides, par exemple NaOH, lysine, N-méthylglucamine, arginine, ornithine ou diéthanolamine.

45

Les doses auxquelles les agents de contraste selon l'invention peuvent être administrés dépendent de la nature du complexe, de la relaxivité qu'il induit, de la voie d'administration et de l'organe visé. Par exemple par voie orale, notamment pour la sphère gastro-intestinale, on pourra administrer de 0,1 à 2 mM/kg et par voie parentérale de 0,001 à 1 mM/kg.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé de préparation des dérivés de poly(aminoacides) chélateurs qui consiste à faire réagir sur la polyamine qui en constitue le squelette, un réactif nucléophile de formule

50



dans laquelle Z' représente un halogène ou un sulfonate et les groupes réactifs de R₁ et X sont éventuellement protégés, pour obtenir les atomes d'azote substitués conformément à l'invention, éventuellement après déprotection des groupes réactifs tels que les hydroxyles et les acides.

55

Comme dans les substitutions nucléophiles classiques, la réaction peut être effectuée dans un solvant aprotique polaire ou non tel qu'acétonitrile, diméthylformamide, toluène ou dans l'eau ou un alcool pur ou aqueux en présence d'une base minérale, tel qu'un hydroxyde ou carbonate alcalin ou alcalino-terreux, ou d'une amine tertiaire, à une température comprise entre la température ambiante et celle de reflux du solvant.

Lorsque tous les atomes d'azote de la polyamine ne doivent pas porter des substituants CH(R₁)X identi-

ques, on peut effectuer des N-alkylations sélectives successives.

Par exemple, dans le cas du 1,4,7,10-tétraazacyclododécane, on peut effectuer une monoalkylation en faisant réagir un net excès du macrocycle sur $Z'(CH(R_1))X$ dans des conditions opératoires, convenablement choisies comme décrit dans J. Org. Chem. 58, 3869-3876 (1993) ou en bloquant 3 des N par action de l'orthocarbonate d'éthyle ou d'un acétal de diméthylformamide, comme décrit dans J. Chem. Soc. Chem. Com. 1317-18 (1991); lorsque l'on effectue l'hydrolyse du composé obtenu sans avoir substitué le N non bloqué, on obtient un monoformamide et peut effectuer la trialkylation des 3 autres N.

On peut aussi obtenir des composés dissymétriques par un choix convenable des réactifs conduisant à la préparation du squelette polyamine; des exemples de ces réactions sont donnés dans EP-299 795, pour la préparation de dérivés linéaires ou cycliques.

Dans le cas de certains substituants R_1 , notamment ceux de formule R_2-G-R_3 , dans lesquels R_3 est une macromolécule et G est un groupe amido, il est avantageux de préparer les dérivés selon l'invention par l'intermédiaire de composés de formule I dont les atomes d'azote comportent des substituants de formule $CH(R'_1)X$, R'_1 étant de faible masse moléculaire, comportant de 2 à 5 carbones environ.

Ces intermédiaires de synthèse sont un autre objet de l'invention.

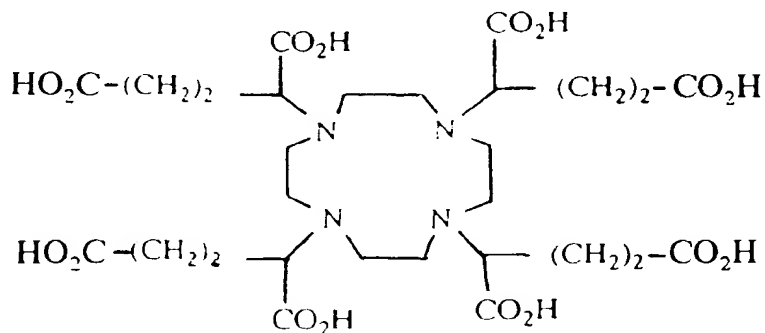
Ces dérivés sont représentés par les formules I, II, III, pour lesquelles les significations des lettres sont identiques à celles mentionnées précédemment à l'exclusion de celle de $CH(R_1)X$ qui est $CH(R_2-G')X'$, G' étant un groupe fonctionnel réactif, précurseur de G dont $COOR'$, SO_3R' , PO_3R' , NHR' , SO_2NHR' , $N=C=S$, $N=C=O$, OH et X' représente X ou X protégé, notamment sous forme d'ester.

Par groupe précurseur de G, on entend tous les groupes fonctionnels connus pour permettre la formation d'une liaison covalente dans des conditions opératoires accessibles dans l'industrie et par exemple, outre les groupes précédents, ceux utilisés pour les greffages sur des protéines.

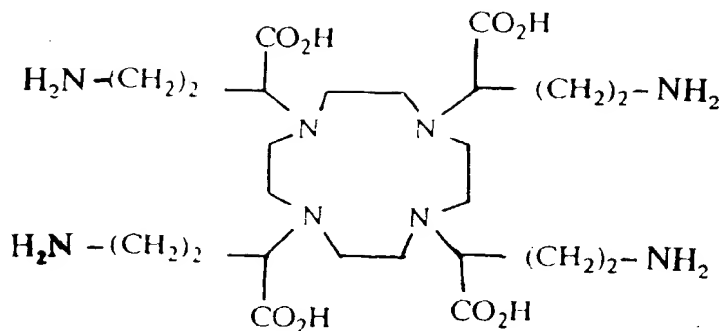
Ces dérivés peuvent être préparés, comme précédemment décrit pour les dérivés de l'invention de formule I, mais avec les réactifs nucléophiles $Z'CH(R_2G')X'$.

Le couplage de ces intermédiaires aux dérivés réactifs de R_3 pour donner le ligand selon l'invention, dont au moins 3N portent un substituant $CH(R_2-G-R_3)X$, peut être réalisé selon des méthodes classiques, notamment celles couramment employées dans les synthèses peptidiques, ou encore après activation des acides sous forme d'halogénures d'acide, d'anhydrides ou en présence d'un agent déshydratant tel que les carbodiimides; selon la nature de G' et du groupe réactif de R'_3 , on pourra effectuer une alkylation ou une acylation d'amine, ou la condensation d'un aldéhyde sur une amine suivie d'une réduction.

Parmi ces intermédiaires de synthèse, on peut citer ceux de formule



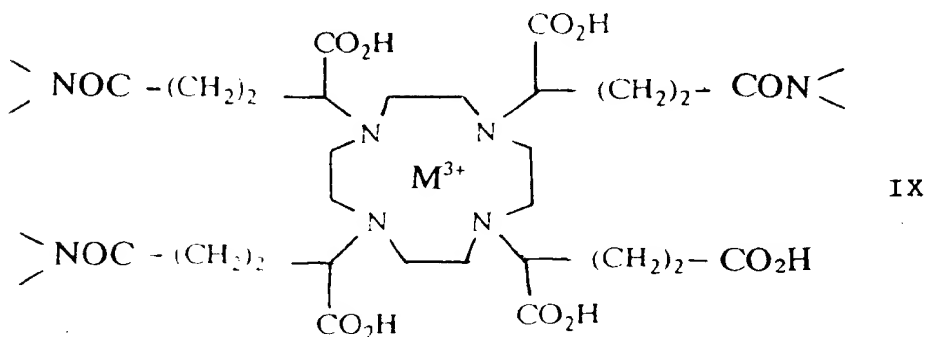
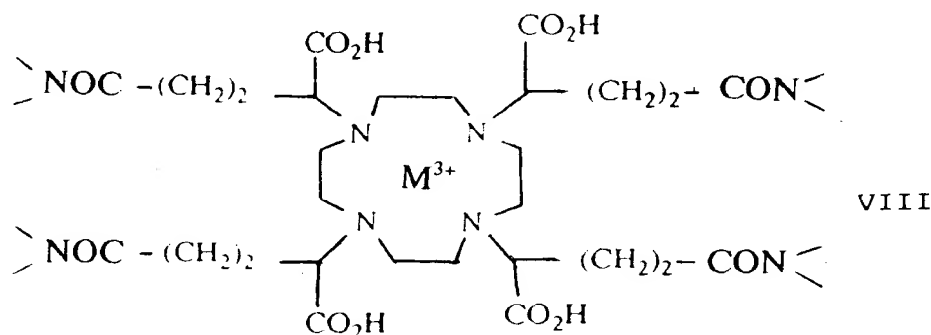
et les dérivés de formule



et leurs esters d'alkyle ou sels.

15 Les composés de formule VI sont particulièrement intéressants, en ce qu'ils permettent d'obtenir des tri- ou tétraamides dérivés des carboxyles sur le C en γ de l'azote sans modification des CO_2H en α , lorsque la réaction d'amidification est effectuée par action d'un chélate de VI sur une amine en présence d'un agent déshydratant tel qu'un carbodiimide en milieu aqueux ou organique.

20 Selon les conditions opératoires, proportions relatives de réactifs, solvant, durée et température de la réaction, et la réactivité de l'amine mise en oeuvre, on obtient un composé de formule VIII ou IX, ou leurs mélanges.



50 dans lesquels M^{3+} est de préférence Gd^{3+} , ce qui permet d'obtenir directement le complexe utile comme agent de contraste, mais M^{3+} pourrait être tout cation chélaté par le ligand de formule VI; M^{3+} devrait alors, être séparé des ligands VIII ou IX par action d'un acide tel que HCl , H_2S ou HCN , les ligands étant ensuite mis à réagir avec un oxyde ou un sel de l'élément paramagnétique à complexer.

Il est évident que ce procédé peut être appliqué pour la préparation d'amides à d'autres composés dont le bras latéral comporte une fonction acide et X est CO_2H ou PO_3H .

55 En effet, il permet la protection sélective des différents acides et amines impliqués dans la coordination du métal.

Les complexes métalliques des dérivés de formule I, et ceux des intermédiaires de synthèse de formule VI peuvent être préparés de façon classique par action d'un équivalent de l'oxyde ou d'un sel du métal en milieu

aqueux de préférence à une température supérieure à 20°C mais inférieure à 90°C.

Dans ce qui suit, on décrit des exemples de préparation de composés intermédiaires et de ligands ou chélates selon l'invention.

EXEMPLES

EXEMPLE 1

Préparation du composé de formule

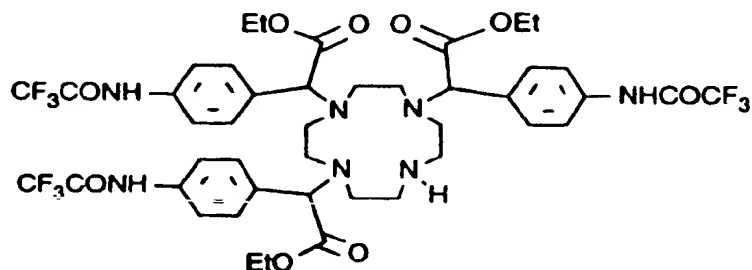
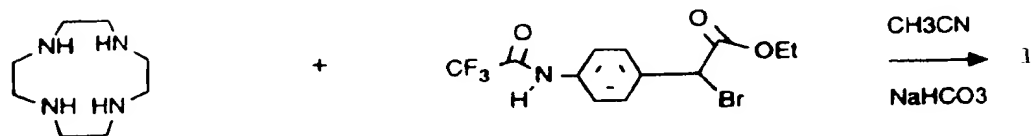
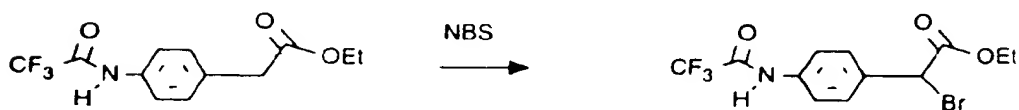
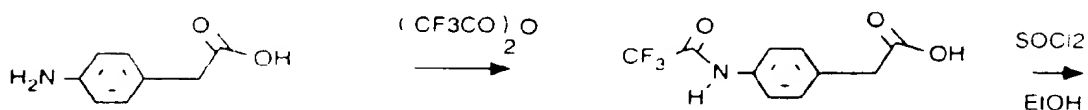


Schéma réactionnel :



1. Acide 4-(trifluoroacétamido)benzèneacétique

Ce composé est préparé selon la méthode décrite par K.D. JANDA et coll. (J. Am. Chem. Soc. 113 n° 1, p. 291 (1991)) avec un rendement de 75%.

10 g d'acide 4-aminophénylacétique donnent 12 g de dérivé trifluoroacétylé caractérisé par RMN¹H. δ ppm (DMSO) : 7,45 (d, 4H) ; 7,56 (s, 2H) ; 11,15 (s, 1H).

2. 4-(trifluoroacétamido)benzèneacétate d'éthyle

Ce composé est obtenu au départ de l'acide précédemment préparé selon la méthode décrite par K.D. JANDA (J.A.C.S. 113 n° 1, p. 291 (1991)) avec un rendement de 33%. 12 g d'acide sont convertis en 4,4 g d'ester qui sont caractérisés en RMN¹H (δ ppm) DMSO : 1,1 (t, 3H) ; 3,6 (s, 2H) ; 4,05 (q, 2H) ; 7,4 (q, 4

H).

3. α -Bromo 4-(trifluoroacétamido)benzèneacétate d'éthyle

4 g (14,5 mmol) d'ester précédemment préparés sont mis en suspension dans CCl_4 (150 cm^3). Le mélange est agité et porté à léger reflux. 2,8 g de N-bromo succinimide et 0,2 cm^3 de solution concentrée d'acide bromhydrique (38%) sont introduits dans le réacteur et le milieu est agité, à reflux, durant 48 h. L'insoluble est filtré et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié sur silice (éluant CH_2Cl_2) pour conduire à 2g de produit purifié.

Rendement : 40%

RMN¹H (δ ppm) : 1,2 (t, 3H) ; 4,1 (q, 2H) ; 5,9 (s, 1H) ; 7,6 - 7,8 (m, 4H) ; 11,4 (s, 1H).4. Préparation du composé 1

A une solution de 60 mg (0,35 mmol) de 1,4,7,10-tétraazacyclododécane dans 10 cm^3 d'acétonitrile sont ajoutés 120 mg de NaHCO_3 et 500 mg de dérivé bromé précédemment préparé. La suspension est agitée à une température de 40°C durant 48 h. Le milieu réactionnel est ensuite filtré et le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris à l'éther isopropylique pour donner 600 mg de produit brut sous forme de poudre. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/MeOH 90/10 puis 80/20).

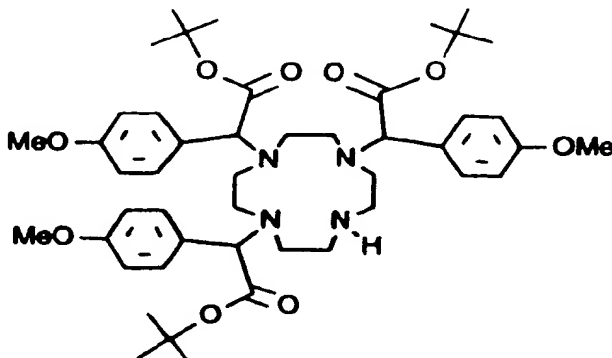
Masse obtenue : 110 mg

Rendement : 32%

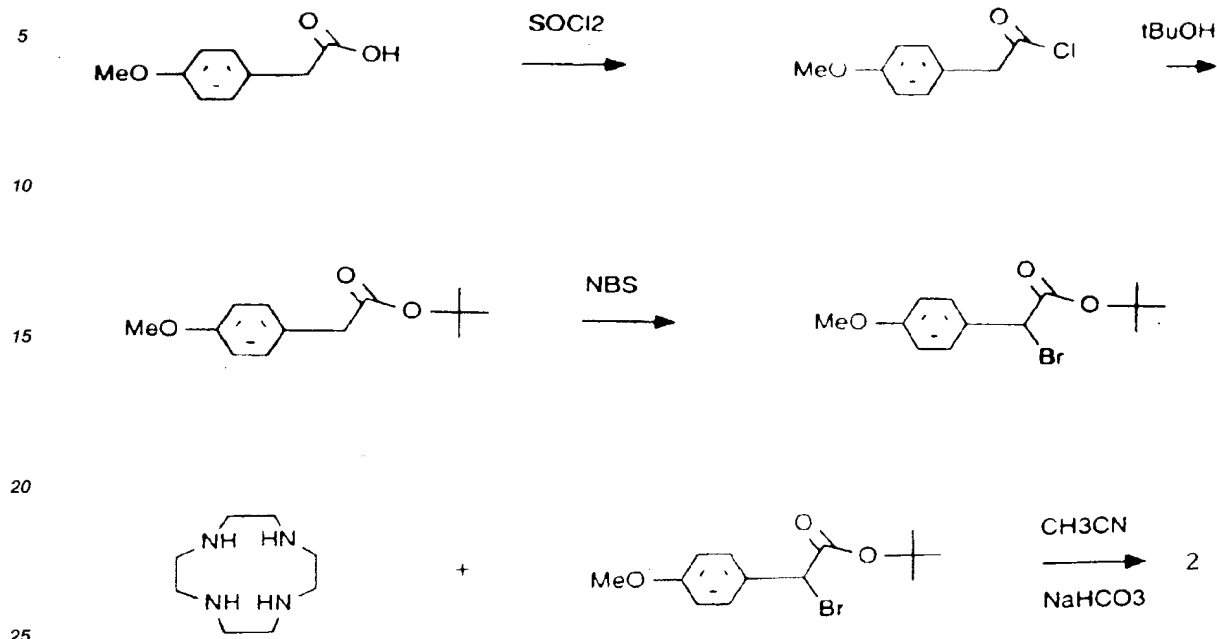
RMN ¹³C (δ ppm) CDCl_3 : 14,6 ; 61,7 ; 63-67 ; 116 (CF_3) ; 130,6-136 (C aromatiques) ; 155 (CONH) ; 172 CO.

Les fonctions amines du composé 1 sont ensuite déprotégées par action de NaBH_4 dans l'éthanol comme décrit dans Chem. Ber. 103, 2437 (1970).

On obtient ainsi un composé intermédiaire de l'invention, pour lequel $\text{R}_2 = \text{C}_6\text{H}_4$ et G' est NH_2 , précurseur d'un composé qui comporte 3 substituants, selon l'invention.

EXEMPLE 2**Préparation du composé de formule**

2

Schéma réactionnel1. paraméthoxyphénylacétate de t-butyle

Le produit est préparé selon la méthode décrite par H. GOTTHARDT et coll. (Chem. Ber. 109, p. 740 (1976)) et P.G. NATTINGLY (J. Org. Chem. 46 p. 1557 (1981)). Au départ de 15 g d'acide paraméthoxyphénylacétique, 5 g d'ester t-butylque sont obtenus.

Rendement : 28%

RMN¹H (δ ppm) : 1,3 (9H, s) ; 3,46 (2H, s) ; 3,75 (3H, s) ; 6,8 - 7,3 (5H, q).

2. α-bromoparaméthoxyphénylacétate de t-butyle

Le produit est préparé selon la méthode décrite par H. GOTTHARDT et coll. et P.G. MATTINGLY.

5 g d'ester t-butylque précédemment préparés conduisent à 2,5 g de dérivé bromé.

Rendement : 33%

RMN¹H (δ ppm) : 1,48 (9H, s) ; 3,82 (3H, s) ; 5,28 (1H, s) ; 6,83 - 7,6 (5H, m).

3. Préparation du composé 2

600 mg de NaHCO₃ sont ajoutés à une solution constituée de 285 mg de 1,4,7,10-tétraazacyclododécane (1,65 mmol) dans 30 cm³ d'acétonitrile sous agitation. 2 g d'ester α-bromé précédemment préparés sont introduits à la suspension et le milieu réactionnel est agité 48 h à température ambiante. Après filtration et évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : CH₂Cl₂ / AcOEt/MeOH 80/10/4) pour conduire à 500 mg de produit purifié.

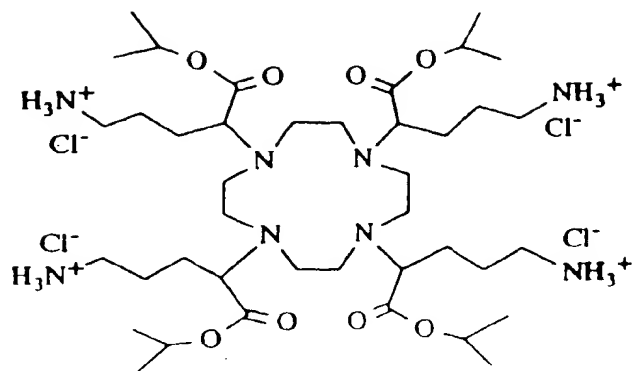
Spectre de masse (FAB⁺) : pic 833

RMN¹³C (δ ppm) 27,6 (CH₃ t-butyle) ; 45-50 (cycle) ; 54,9 (C₃O) ; 61,1 (t-butyle) ; 68 (NCH) ; 113,6 - 127,2 - 130,4 - 158 (C aromatiques) ; 171 (C = O).

Les fonctions phénols du composé 2 sont ensuite libérées par action du tribromure de bore comme décrit dans Org. Synth. coll. vol. V, 412 (1973) ou dans J. Org. chem. 44, 4444 (1979).

On obtient ainsi un composé intermédiaire de l'invention pour lequel R₂ = C₆H₄ et G' est OH, qui peut être substitué de façon classique.

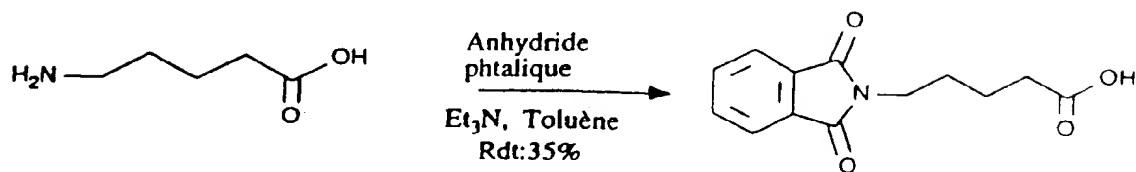
EXEMPLE 3Préparation du composé de formule



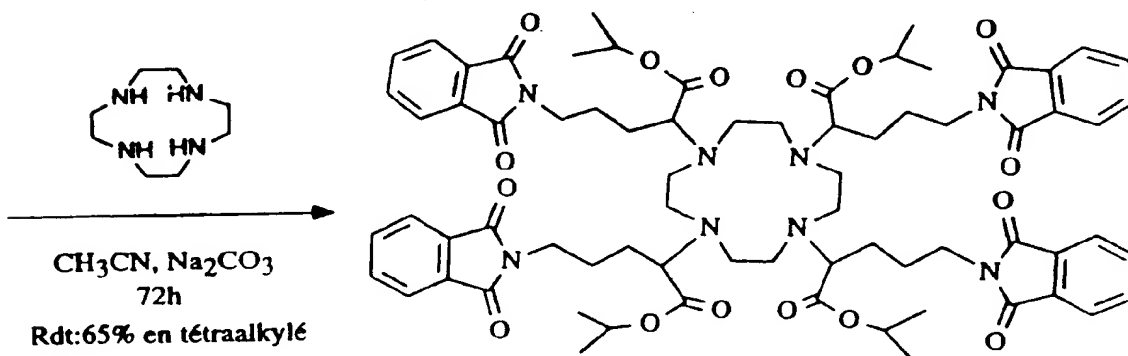
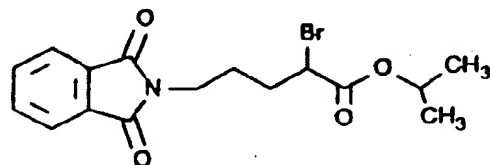
3

15 de l'acide correspondant et du complexe avec Gd^{3+}

Schéma réactionnel



30 1) $SOCl_2$, CCl_4
2) N.B.S., HBr 48%
3) $iPrOH$



50 1) Hydrazine Hydrate
MeOH

55 2) HCl dilué

3

1. Acide 5-(N-phthalimido)-pentanoïque

12,6 g (85,1 mmole) d'anhydride phthalique, 10 g (85,1 mmole) d'acide 5-amino-valérique, 1,2 ml (8,51 mmole) de triéthylamine et 130 ml de toluène sont mélangés et agités à reflux 1 h dans un tricol équipé d'un Deanstark pour éliminer l'eau formée par azéotropie. Après une nuit à température ambiante, le précipité formé est filtré, lavé avec de l'heptane, puis 200 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 1N, puis 100 ml d'eau. Après séchage, 7,37 g d'acide 5-(N-phthalimido)-pentanoïque sont obtenus sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 35% (MP = 115°C).

RMN¹H (CDCl₃) δ(ppm) : 7,8 (m, 2H) ; 7,7 (m, 2H) ; 3,7 (t, 2H) ; 2,4 (t, 2H) ; 1,7 (m, 4H) ;

¹³C (CDCl₃) : δ(ppm) : 178 ; 168 ; 134 ; 133,9 ; 123,2 ; 37,4 ; 33,3 ; 27,9 ; 21,8.

2. Ester isopropylique de l'acide 2-bromo-5-(N-phthalimido)-pentanoïque

7,2 g (29,1 mmole) d'acide 5-(N-phthalimido)-pentanoïque sont ajoutés à une solution de 3 ml de tétrachlorure de carbone et 8,5 g (116 mmole) de chlorure de thionyle. La solution est portée à reflux 1 heure ; 14 ml de tétrachlorure de carbone, 6,2 g (34,9 mmole) de N-bromo succinimide et 2 gouttes d'acide bromhydrique aqueux à 48% sont ajoutés, et la solution est laissée à reflux 2 heures. La solution refroidie est versée sur 60 ml d'isopropanol et agitée 30 minutes. Après évaporation sous vide, l'huile obtenue est purifiée sur silice en éluant avec un mélange 50 dichlorométhane / 50 heptane puis dichlorométhane. Après évaporation des solvants, 8,2 g d'ester isopropylique de l'acide 2-bromo-5-(N-phthalimido)-pentanoïque sont obtenus avec un rendement de 76,6% sous forme d'une huile jaune pâle qui cristallise (M.P. : 75°C). RMN¹H (CDCl₃) : δ(ppm) : 7,85 (m, 2H) ; 7,7 (m, 2H) ; 5 (h, 1H) ; 4,2 (t, 1H) ; 3,7 (t, 2H) ; 1,7 - 2,2 (m, 4H) ; 1,2 (d, 3H) ; 1,25 (d, 3H).

¹³C (CDCl₃) : δ(ppm) : 168,5 ; 168 ; 133,9 ; 132 ; 123,2 ; 69,7 ; 45,5 ; 36,9 ; 31,9 ; 26,9 ; 21,5 ; 21,3.

3. Tétraisopropylester de l'acide -1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétra-[2-(5-N-phthalimido) pentanoïque]

0,92 g (5,34 mmole) de 1,4,7,10-tétraazacyclododécane, 11,8 g (32,1 mmole) du composé (2) et 3,4 g (32,1 mmole) de carbonate de sodium et 36 ml d'acétonitrile sont agités à reflux 72 h. Après filtration, évaporation sous vide, l'huile obtenue est reprise dans du dichlorométhane et lavée avec de l'eau. Après séchage et évaporation du dichlorométhane, le résidu obtenu est purifié par deux chromatographies flash sur silice, successives avec comme premier éluant un mélange 95 CH₂Cl₂/5 CH₃OH, puis comme deuxième éluant 95 CH₃COOC₂H₅/5CH₃OH. Après évaporation des solvants, 4,62 g de tétraisopropylester de l'acide -1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétra-[2-(5-N-phthalimido) pentanoïque] sont obtenus avec un rendement de 65% sous forme de cristaux amorphes.

RMN¹H (CDCl₃) : δ(ppm) : 7,5 - 7,85 (m, 16H) ; 4,8 - 5,1 (m, 4H) ; 1 - 3,8 (m, 72 H)

¹³C (CDCl₃) : δ(ppm) : 167 ; 166,9 ; 162,8 ; 128,4 ; 126,9 ; 117,8 ; 62,2 ; 57,9 ; 45,3 ; 45 ; 32,5 ; 22,3 ; 20,4 ; 16,9 ; 16,7.

4. Ester tétraisopropylique de l'acide -1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétra-[2-(5-amino) pentanoïque], tétrachlorhydrate

1 g (0,76 mmole) de tétraisopropylester de l'acide -1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétra-[2-(5-N-phthalimido) pentanoïque], 0,15 ml d'hydrazine hydrate (3,04 mmole) et 8 ml de méthanol sont agités à reflux pendant 1 heure. A température ambiante, 10 ml d'acide chlorhydrique 0,5 M sont ajoutés. Le précipité formé est éliminé par filtration, et le filtrat est évaporé.

5. Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétra-[2-(5-amino)pentanoïque](chlorhydrate)

3,1 g du dérivé phthalimido obtenu selon 3 et 270 ml de solution aqueuse de HCl 6N sont maintenus au reflux, sous agitation pendant plusieurs jours; on concentre alors sous pression réduite jusqu'à 20ml, sépare le solide, extrait à l'éther éthylique et amène à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur silice silanisée, en éluant à l'eau; la solution aqueuse du produit recherché est concentrée et le résidu concrétisé dans l'éthanol, pour donner 1,15 g de l'acide.

F = 250°C

RMN¹H (D₂O) δppm : 3,8-4 (m,4H); 2,8-3,6 (m,24H); 1,5-2,2 (m,16H)

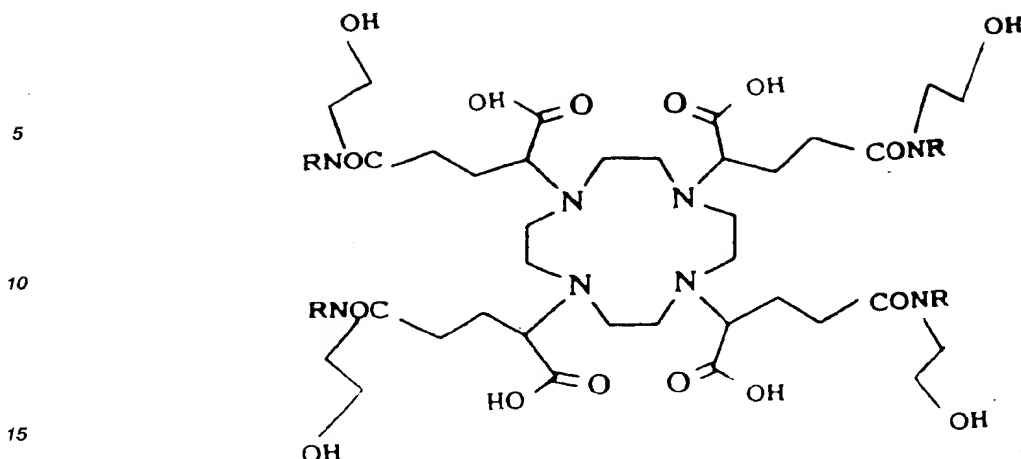
6. Complexe de l'acide précédent avec Gd³⁺

1,2 g du produit précédent et 0,5 g de GdCl₃ · 6H₂O sont dissous dans 17 ml d'eau. Le pH du milieu évolue avec la réaction; il est maintenu à 6 par addition d'une solution aqueuse de NaOH 1N; lorsque le pH est stabilisé à 6, une nouvelle addition de NaOH, l'amène à 7 avant concentration sous pression réduite. Le solide obtenu est concrétisé dans l'éthanol à 75% (V/V).

On obtient ainsi 1,1 g du produit recherché sous forme de cristaux beiges qui fondent à plus de 300°C.

EXEMPLE 4

1,4,7,10-tétrakis {3-[N(2-hydroxyéthyl)-N-(1-déoxyglucitol)-carboxamido]-1-carboxypropyl}-1,4,7,10-tétraazacyclododécane (complexe de gadolinium, sel de Na composé n° 4).



R = CH₂ - (CH₂OH)₄ - CH₂OH

1. 1,4,7,10-tétrakis-[N,N',N'',N'''-1-(1,3-diméthoxycarbonyl-propyl)]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane
43 g (0,18 mol) de diméthyl 2-bromoglutarate préparés selon T.R. HOYE J. Org. Chem. 1982, 47, 4152-4156 sont ajoutés goutte à goutte à un mélange de 4,3 g (0,025 mol) de 1,4,7,10-tétraazacyclododécane, 25 g (0,18 mol) de carbonate de potassium, 100 ml d'acétonitrile, à 50°C. La suspension est agitée 48 heures à cette température, puis filtrée. Après évaporation à sec de l'acétonitrile, le résidu est purifié deux fois par chromatographie flash sur silice avec un gradient de dichlorométhane-méthanol. Après évaporation des solvants, 15 g de poudre beige sont obtenus avec un rendement de 75%.

CCM : SiO₂ CH₂Cl₂ - CH₃OH (9-1)

R_f = 0,8

2. 1,4,7,10-tétrakis-[N,N',N'',N'''-1-(1,3-dicarboxypropyl)]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane

15 g (0,019 mol) de composé 1,4,7,10-tétrakis-[1,3 diméthoxycarbonyl-propyl]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane sont agités dans 100 ml de méthanol et 250 ml de solution aqueuse de NaOH N pendant 16 heures à température ambiante. L'octa-acide en solution est purifié par fixation sur résine IRA 458 commercialisée par Rohm et Haas puis élution par un gradient d'acide acétique. Après évaporation des solvants, 11 g de poudre blanche sont obtenus avec un rendement de 85%.

CCM : SiO₂ CH₃COOC₂H₅-CH₃OH-CH₃COOH (35 - 35 -40)

R_f = 0,2

RMN¹³C DMSO (δ ppm) 31,13 ; 47,50 ; 61,13 ; 61,76 ; 172,29 ; 174,9 ;

Spectre de Masse (FAB⁺) pic = 693

3. Complexe avec le gadolinium du composé intermédiaire précédent (pentasél de Na)

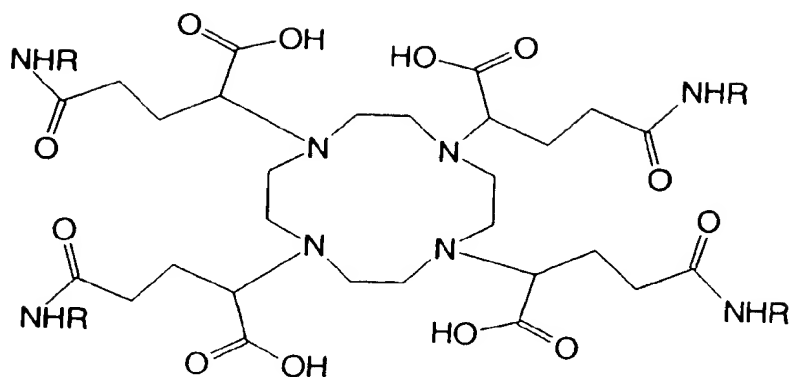
Une suspension de 12,1 g (0,0175 mol) du composé obtenu selon 2 et 6,5 g (0,0175 mol) de GdCl₃·6H₂O dans 225 ml d'eau est amené à pH 6,5 par addition d'une solution aqueuse de NaOH 1N et maintenue à ce pH par des additions successives. Lorsque le pH n'évolue plus, l'eau est éliminée sous pression réduite pour donner 19,8g de poudre blanche, mélange du produit final avec NaCl.

4. Complexe de gadolinium du 1,4,7,10 tétrakis[3-[N-(2-hydroxyéthyl)-N-(1-déoxyglucitol)-carboxamido]-1-carboxypropyl]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane. monosél de sodium (composé n° 4)

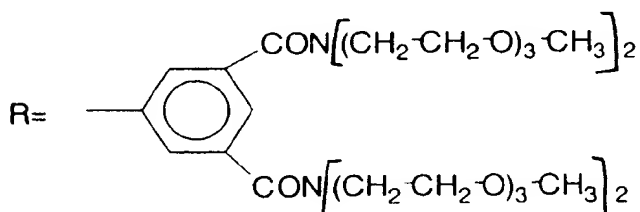
A une suspension de 2 g (2,9 mmol) du composé obtenu en 2 dans 100 ml d'eau avec 1,1 g (2,9 mmol) de chlorure de gadolinium (III) hexahydrate, à 80°C, est ajoutée une quantité suffisante de solution aqueuse de NaOH 0,1 N pour un pH de 4,3. La solution obtenue est amenée à pH 7 par ajout de la même solution de NaOH puis concentrée à un volume de 10 ml. Après ajout de 2,8 g (12,2 mmol) de 1-déoxy-1-(2-hydroxyéthylamino) D-glucitol, le pH est amené à 5,3 par addition d'acide chlorhydrique aqueux 1N et 2,3 g (12,2 mmol) de chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide sont ajoutés, et la solution agitée 16 heures à température ambiante. La solution est amenée à pH 3,5 par addition de résine IRN 77 commercialisée par Rohm et Haas, filtrée, ajustée à pH 5,5 à l'aide de solution aqueuse de NaOH 0,1 N, puis éluee sur silice silanisée. Par évaporation de l'eau puis lavage du résidu deux fois par 100 ml d'éthanol et séchage, 4 g de poudre blanche sont obtenus.

EXEMPLE 5

Complexe de gadolinium du composé n° 5 de formule



avec



1. Préparation de R-NO₂

1g de chlorure de l'acide 5-nitroisophtalique sont introduits à 0°C dans une solution de 2,5 g de bis-(trioxa-3,6,9)décylamine, préparée selon la méthode décrite dans Tetrahedron 47 411 (1991), et 1,12 ml de triéthylamine dans 10 ml de dichlorométhane. Le milieu est laissé 2 heures sous agitation à température ambiante puis lavé à l'eau, séché sur Na₂SO₄ et concentré. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice en éluant avec un mélange de CH₂Cl₂/CH₃OH (95/5). On obtient ainsi 2,26 g du produit recherché, sous forme d'huile jaune.

2. 5-amino,N,N,N',N'-tétrakis(trioxa-3,6,9 décyl)1,3-phényldicarboxamide (RNH₂)

2,2 g de dérivé nitré précédent dans 10 ml d'éthanol sont hydrogénés, en présence de Pd/C à 10%, sous une pression de 10⁵ Pa à la température de 20°C. Après filtration et concentration sous pression réduite du milieu on obtient 2 g de l'amine sous forme d'huile jaune.

RMN¹H (CDCl₃) δ(ppm); 6,7 (s,2H); 6,6(s,1H); 3,35-3,7 (m,48H); 3,25 (s,12H).

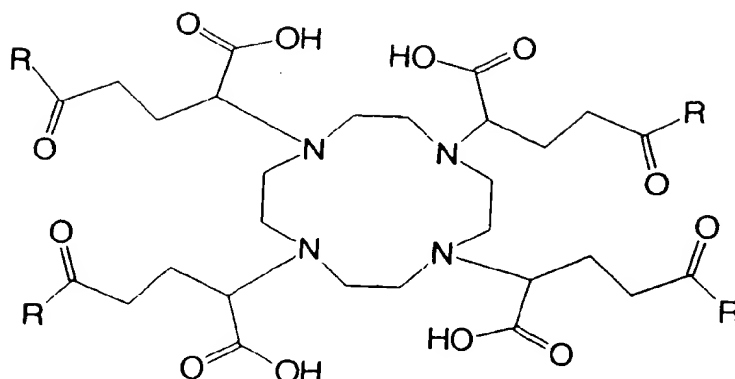
3. Complexe du composé n° 5 avec Gd³⁺

1 g du complexe obtenu à l'étape 3 de l'exemple 4, 3,23 g de RNH₂ et 6,8 g de 1-(3-diméthylamino-propyl)-3-éthylcarbodiimide (chlorhydrate) sont dissous dans 13 ml d'eau; la solution est laissée 48 heures, sous agitation, à température ambiante avec une addition de temps en temps d'une solution aqueuse de HCl 1N pour maintenir un pH voisin de 7. Le milieu est amené à 150 ml par addition d'eau puis soumis à une ultrafiltration dans une cassette miniset de type nova, commercialisée par FILTRON (USA), avec une membrane de seuil de coupure 3 KDaltons.

Le produit recherché a un temps de rétention de 30 minutes, lors d'une gel-filtration dans une colonne Pharmacia de 60 cm x 2 cm remplie de gel Superdex^R 75, avec un débit d'éluant (H₂O) de 1 ml par minute.

EXEMPLE 6

Complexe avec Gd³⁺ du composé n° 6 de formule (sel de sodium)



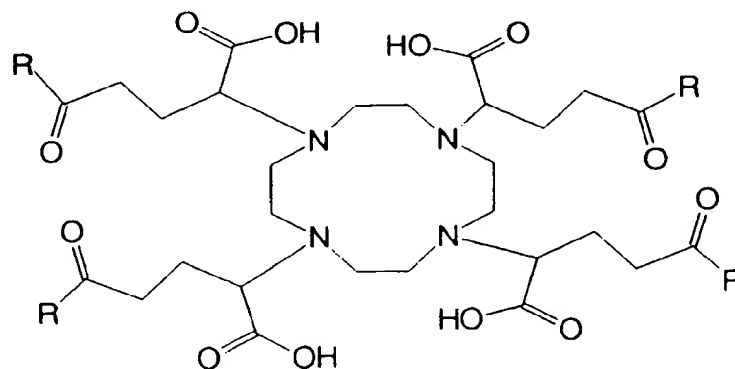
avec $R = \text{HN}(\text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{-CH}_2\text{OH})_2$.

On dissout 1 mmol du complexe obtenu à l'étape 3 de l'exemple 4 et 4, 6 mmol de bis-(2,3,4,5,6-penta-hydroxy hexyl)amine commerciale dans 13 ml d'eau; le pH de la solution est amené à 6 par addition d'une solution aqueuse de HCl 2N, puis on ajoute 21 mmol de chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthyl-carbodiimide; après 4 heures d'agitation, on ajoute de nouveau 21 mmol du carbodiimide dans le milieu; après une nuit d'agitation on ajoute 100 ml d'eau et filtre la solution sur une résine IRN77, sous forme H^+ commercialisée par Rohm et Haas, puis sur une résine IRA 458, sous forme OH^- , commercialisée par Rohm et Haas; la solution finale est ultrafiltrée dans une cassette FILTRON, cassette FILTRON, équipée d'une membrane de 1 kDalton de seuil de coupure.

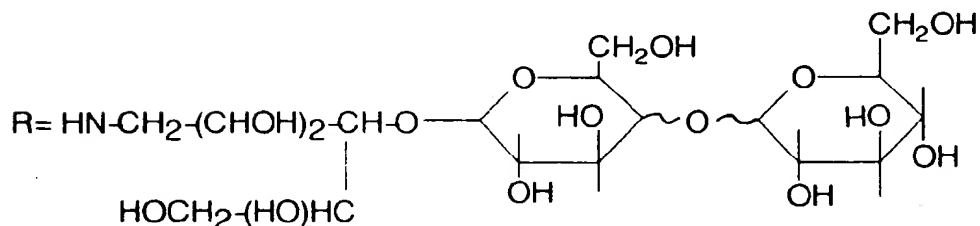
le produit final a un temps de rétention de 78 minutes dans une gel-filtration sur Superdex^R 30, avec un débit d'éluant (tampon phosphate pH = 7,2) de 1 ml/minute.

EXEMPLE 7

Complexe avec Gd^{3+} du composé n° 7 de formule



avec



1. Préparation de $\text{RCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ puis RH d'après J. Carbohydrate Chemistry 11(7) 813-835 (1992)

On introduit 8,2 ml de benzylamine distillée dans une solution à 60°C de 23,6 g de maltotriose dans 16 ml d'eau. Après 3 heures d'agitation à cette température, on ajoute 60 ml de méthanol et amène le milieu vers 25°C avant d'ajouter par portions 3,56 g de borohydrure de sodium.

Après 48 heures d'agitation à 20°C, la solution est concentrée et le résidu dissous dans 100 ml de méthanol; on ajoute une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 4N jusqu'à pH 3 et on concentre après addition de 2 volumes de méthanol. Le résidu est dissous dans 100 ml de méthanol, filtré, puis la solution est concentrée. Le solide résiduel est lavé à l'éthanol à 70°C puis séché pour donner 25,6 g de $\text{RCH}_2\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{HCl}$. L'amine est libérée par action d'une résine IRA 458 commercialisée par Rohm et Haas et purifiée par passage sur une résine IRN77. On obtient ainsi 17,7 g de solide. CCM (silice Merck 60 F) éluant : dioxane/eau/ NH_3 aqueux 25% (p/V : 8/3/2) $R_f = 0,7$

La benzylamine obtenue est dissoute dans 100 ml d'eau et on ajoute une solution aqueuse de NH_4OH à 25% jusqu'à pH 9. Après addition de 4 g de Pd/C le mélange est hydrogéné sous une pression de 6 x 10⁵Pa pendant 5 heures à 40°C et 12 heures à température ambiante.

Après filtration, on élimine le solvant sous pression réduite et on purifie l'huile par passage sur une résine IRN77, sous forme H^+ . On obtient 10,9 g du solide recherché.

CCM (conditions précédentes) $R_f = 0,2$

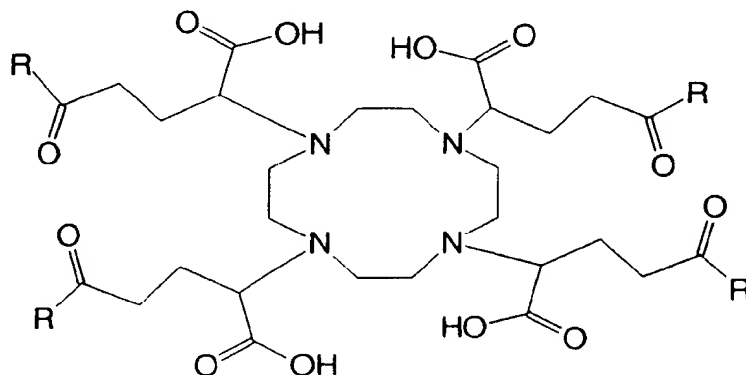
RNM^{13}C (D_2O) : 40,6 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 57,7-59,5 (CH_2OH) 66,6-70,1 (CHOH); 74,1 et 79,2 (C-O); 97 et 07,6 (O-C-O).

2. Complexe du composé n° 7 avec GdE^{3+}

On introduit à 60°C 4,66 g du produit précédemment obtenu dans 210 ml de diméthylformamide, puis 1g du complexe de Gd^{3+} obtenu à l'exemple 4 (3), 886 mg d'hydroxy-1 benzotriazole, 1,25 g de chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide et 0,9 ml de triéthylamine. Le milieu est maintenu 5 heures sous agitation à 60°C puis 48 heures à température ambiante, avant de concentrer sous pression réduite. Le résidu est trituré dans CH_2Cl_2 puis purifié par ultrafiltration sur une mini-cassette FILTRON avec une membrane de seuil de coupure 1 kDalton.

EXEMPLE 8

Complexe avec Gd^{3+} du composé n° 8 de formule



avec $\text{R} = \text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_3$

L'éther méthylique de l'aminopolyéthylène glycol (MM = 5000) peut être préparé selon l'une des méthodes précédemment citées ou acheté dans le commerce.

15 g de l'amine sont dissous à 40°C dans 700 ml de diméthylformamide et une solution de 0,5 g du complexe de Gd^{3+} préparé à l'exemple 4 (3) dans 50 ml d'eau sont ajoutés, puis 0,48 g d'hydrate d'hydroxy-benzotriazole, 0,5 ml de triéthylamine et 2,72 g de chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide.

Après 5 jours d'agitation à température ambiante, on concentre la solution sous pression réduite. Le résidu, dissous dans 150 ml d'eau, est ultrafiltré dans une minicassette FILTRON avec une membrane de seuil de coupure 5 kDaltons.

Après lyophilisation, on isole 3,5 g de produit, mélange de triamide (l'un des $\text{R} = \text{OH}$) et de tétraamide.

Revendications

1. Dérivés de poly(aminoacides), chélateurs d'ions métalliques paramagnétiques dont au moins 3 des atomes d'azote donateurs portent des substituants, identiques ou différents, de formule



dans laquelle X représente CO_2R_a , CONR_bR_c ou $\text{P}(\text{R}_d)\text{O}_2\text{H}$ et R_a , R_b , R_c identiques ou différents représentent H ou $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$, éventuellement hydroxylé; R_d représente OH, $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$ ou $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkoxy}$; et R_1 représente un groupe hydrophile de masse moléculaire supérieure à 200, comportant au moins 3 atomes d'oxygène

étant entendu qu'au moins 3 des groupes X sont des fonctions acides, éventuellement salifiées.

2. Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que R_1 représente un groupe poly[oxy($\text{C}_2\text{-C}_4$)alkylène] ou poly(hydroxyalkyle), ou le reste d'un oligosaccharide ou d'un polysaccharide monofonctionnalisé.

3. Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que R_1 représente $\text{R}_2\text{-G-R}_3$, et

- R_2 représente rien, alkylène, alkoxyalkylène, polyalkoxyalkylène, alkylène interrompu par phénylène, phénylène ou un reste hétérocyclique saturé ou non;

- G représente une fonction O, CO, OCO, COO, SO_3 , OSO_2 , CONR' , $\text{NR}'\text{CO}$, $\text{NR}'\text{COO}$, OCONR' , NR' , $\text{NR}'\text{CS}$, CSNR' , $\text{SO}_2\text{NR}'$, $\text{NR}'\text{SO}_2$, $\text{NR}'\text{CSO}$, OCSNR' , $\text{NR}'\text{CSNR}'$, $\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{NR}'$, $\text{NR}'\text{P}(\text{O})(\text{OH})$, dans laquelle R' est H, $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$ ou R_3 ;

- R_3 représente alkyle, phényle, alkyle substitué, ou interrompu par un ou des groupes phényles, alkylèneoxy; amino ou amido substitués ou non par alkyle éventuellement substitué ou interrompu par l'un des groupes précédents ou R_3 est le reste d'un composé, éventuellement monofonctionnalisé, choisi parmi les saccharides, les oligosaccharides, les peptides, les macromolécules naturelles ou synthétiques biocompatibles ou les molécules ayant un biorécepteur endogène,

les groupes phényles, phénylènes et hétérocycliques pouvant être substitués par OH, Cl, Br, I, $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$, $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyloxy}$, NO_2 , NR_xR_y , NR_xCOR_y , CONR_xR_y , COOR_x , R_x et R_y étant H ou $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$, et

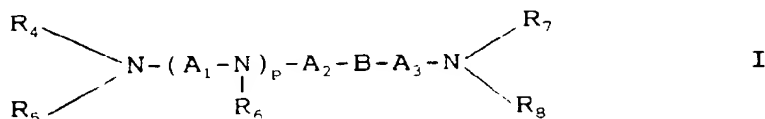
les groupes alkyle, alkylène, alkoxy, en C_1 à C_{14} , linéaires, ramifiés ou cycliques pouvant être hydroxylés, ainsi que les sels de ces dérivés avec des bases minérales ou organiques.

4. Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que X représente CO_2H éventuellement salifié et R_1 représente $\text{R}_2\text{-G-R}_3$ et R_2 représente $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkylène}$, éventuellement interrompu par phénylène, G représente CONR' , $\text{NR}'\text{CO}$ ou O, R' étant H, $(\text{C}_1\text{-C}_8)\text{alkyle}$ ou R_3 , et R_3 représente $(\text{C}_1\text{-C}_{14})\text{alkyle}$ éventuellement substitué ou interrompu par un ou des groupes phényle, $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkoxy}$, alkylèneoxy, amino et amido substitués ou non par alkyle substitué ou interrompu comme précédemment, ou le reste d'un composé éventuellement monofonctionnalisé choisi parmi les saccharides, les oligosaccharides, les peptides, les macromolécules naturelles ou synthétiques biocompatibles, les groupes R_2 , R' et R_3 pouvant en outre être hydroxylés.

5. Dérivés selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils comportent 3 ou 4 groupes $\text{CH}(\text{R}_i)\text{X}$.

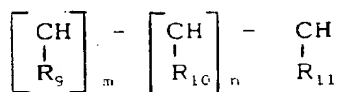
6. Dérivés selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que les groupes $\text{CH}(\text{R}_i)\text{X}$ sont identiques.

7. Dérivés selon l'une des revendications 1 à 6, de formule



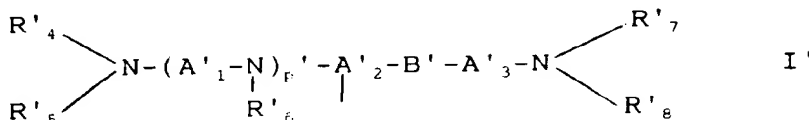
dans laquelle

- A_1 , A_2 , A_3 , identiques ou différentes, représentent



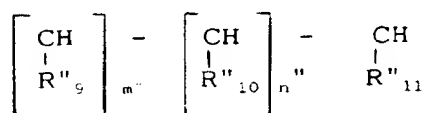
m et n étant des nombres entiers de 0 à 5 dont la somme vaut 1 à 5,

R₉, R₁₀, R₁₁ représentent, indépendamment H, alkyle, alkoxyalkyl, phényle, alkylènephényle, R₁₀ pouvant représenter en outre OH ou alkoxy, ou l'un des R₉ et R₁₁ parmi A₁, A₂, A₃ représente la formule



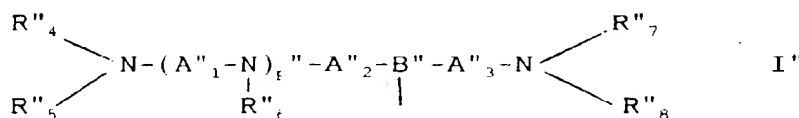
dans laquelle les lettres peuvent voir les significations des lettres de même indice de la formule I, à l'exclusion de l'un des R'₉ et R'₁₁ qui représente (C₁-C₈)alkylène, éventuellement substitué par un ou des (C₁-C₈)alkoxy, l'autre n'étant pas I';

- R₄, R₅, R₆, R₇ et R₈ représentent, indépendamment, H, alkyle, alkoxyalkyle, amidoalkyle substitué ou non, ou CH(R₁₂)X, R₁₂ étant H, alkyle, alkoxyalkyle ou R₁, ou les groupes R₄ et R₇ sont liés et pris ensemble représentent



R''₉, R''₁₀, R''₁₁, m et n pouvant avoir les significations des lettres de même indice dans la formule I

- B est O ou N-W et W représente comme R₅ ou polyoxy-(C₂-C₃)alkylène ou (C₁-C₆)alkylène-Y ou Y, Y étant un hétérocycle saturé ou non de 1 ou 2 cycles accolés, éventuellement substitué par un ou plusieurs OH, alkyle, alkoxy, alkoxyalkyle, ayant jusqu'à 12 sommets, comportant 1 à 4 hétéroatomes choisis parmi O, N, S étant entendu que lorsque W représente Y, le carbone lié à N est lié à 2 atomes de carbone de l'hétérocycle, ou W représente la formule

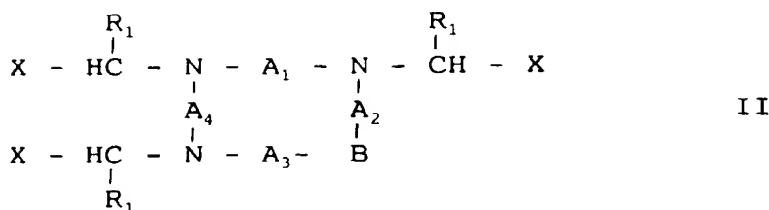


dans laquelle les lettres peuvent avoir les significations des lettres de même indice dans la formule I à l'exclusion de R''₉ et R''₁₁ qui ne peuvent représenter I' et de B'' qui représente N-Q, Q étant (C₁-C₈)alkylène, éventuellement substitué par un ou des alkoxy,

- ou A₂-B-A₃ représente un groupe hétérocyclique dans lequel B est un hétérocycle saturé ou non, de 5 ou 6 sommets comportant 1 ou 2 hétéroatomes choisis parmi O, S, N et A₂ et A₃ représentent un groupe CH-R_e dans lequel R_e est H ou (C₁-C₆)alkyle,
- p est un nombre entier de 0 à 5,

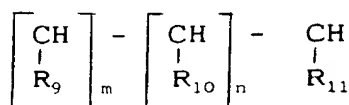
les phényles pouvant être substitués par un ou des groupes OH, Cl, Br, I, (C₁-C₈)alkyle, (C₁-C₈)alkoxy, NO₂, NH₂, NR_xR_y, NR_xCOR_y, CONR_xR_y, COOR_x avec R_x, R_y étant H ou (C₁-C₈)alkyle, et les alkyle, alkylène et alkoxy étant linéaires ou ramifiés, en C₁ à C₁₄ et éventuellement hydroxylés, et leurs sels avec des acides ou des bases minéraux ou organiques.

8. Dérivés selon l'une des revendications 1 à 6 de formule



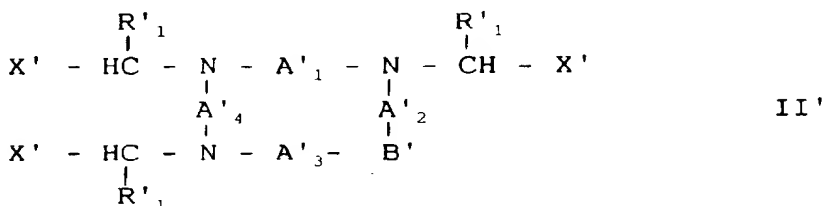
dans laquelle

- les R_1 et X sont identiques ou différents,
- A_1, A_2, A_3, A_4 identiques ou différents représentent



m et n étant des entiers de 0 à 2 dont la somme vaut 1 ou 2,

R_9, R_{10}, R_{11} représentent indépendamment H, alkyle, alkoxyalkyle, phényle, alkylènephényle, R_{10} pouvant représenter aussi OH ou alkoxy ou l'un des R_9 et R_{11} représente la formule



dans laquelle les lettres peuvent avoir les significations des lettres de même indice de la formule II, à l'exclusion de R'_9 ou R'_{11} qui est lié au macrocycle II et représente (C_1-C_8) alkylène, éventuellement substitué par un ou des alkoxy,

- B représente N-W et W représente H, alkyle, alkoxyalkyle, amidoalkyle éventuellement substitué, polyoxy (C_2-C_3) alkylène, ces groupes comportant éventuellement en outre un phényle, (C_1-C_6) alkylène-Y ou Y, Y étant un hétérocycle saturé ou non, de 1 ou 2 cycles accolés, éventuellement substitué par OH, alkyle, alkoxy, alkoxyalkyle, ayant jusqu'à 12 sommets, comportant 1 à 4 hétéroatomes choisis parmi O, N, S, étant entendu que lorsque W représente Y, le carbone lié à N est lié à 2C de l'hétérocycle,

ou W représente la formule II' lorsque R_9 et R_{11} en diffèrent, dans laquelle les lettres peuvent voir les significations des lettres de même indice de la formule II à l'exclusion de B' qui représente N- (C_1-C_8) alkylène, éventuellement substitué par un ou des alkoxy, ou encore W représente $CH(R_1)X$,

- ou A_2-B-A_3 représente un groupe hétérocyclique dans lequel B est un hétérocycle saturé ou non, de 5 ou 6 sommets comportant 1 ou 2 hétéroatomes choisis parmi O, S, N et A_2 et A_3 représentent un groupe $CH-R_6$ dans lequel R_6 est H ou (C_1-C_6) alkyle,

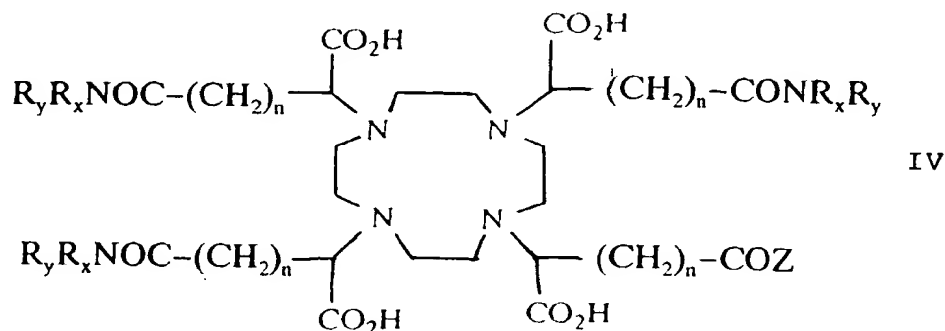
les phényles pouvant être substitués par un ou des groupes OH, Cl, Br, I, (C_1-C_8) alkyle, (C_1-C_8) alkoxy, NO_2 , NH_2 , NR_xR_y , NR_xCOR_y , $CONR_xR_y$, $COOR_x$ avec R_x, R_y étant H ou (C_1-C_8) alkyle, et les alkyle, alkylène et alkoxy étant linéaires ou ramifiés, en C_1 à C_{14} et éventuellement hydroxylés, et leurs sels avec des acides ou des bases minéraux ou organiques.

9. Dérivés selon la revendication 8 de formule II,

dans laquelle A_1, A_2, A_3, A_4 représentent $(CH_2)_n$ avec $n = 2, 3$ ou l'un d'eux représente $(CH_2)_n-CH-R_{11}$ et

les autres $(CH_2)_n$ avec $n' = n - 1$ et R_{11} représente alkyle, phényle ou alkylènephényle, éventuellement substitués, les groupes $CH(R_1)X$ sont identiques et X est CO_2H et B représente N-W.

10. Dérivés selon la revendication 1 de formule



dans laquelle

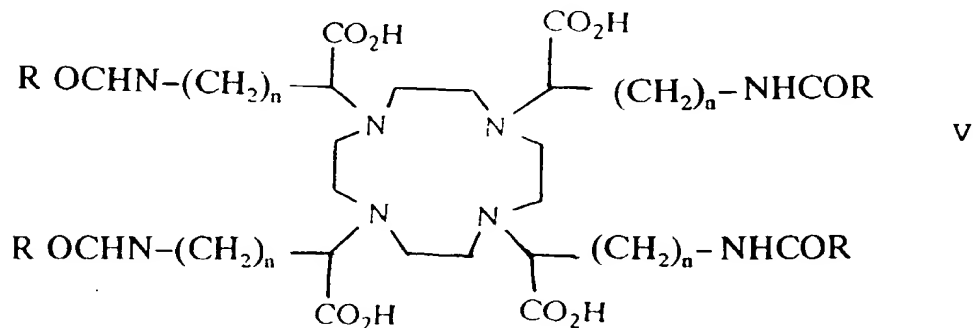
R_x est H, (C_1-C_{14}) alkyle, éventuellement hydroxylé et R_y est (C_1-C_{14}) alkyle hydroxylé, polyoxy(C_2-C_3)alkylène, poly(hydroxyalkyle), ou le reste d'un monosaccharide, d'un oligosaccharide ou d'un polysaccharide éventuellement monofonctionnalisés, R_y comportant éventuellement, en outre, des groupes (C_1-C_4) alkylène ou phénylène liés aux précédents par des fonctions amides ou étheroxydes;

n est 2 ou 3;

et Z représente NR_xR_y ou OH;

ainsi que leurs sels avec des bases minérales et organiques.

11. Dérivés selon la revendication 1 de formule

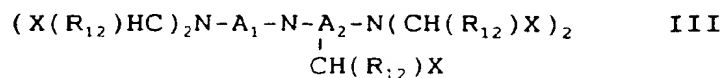


dans laquelle

n est 2 ou 3;

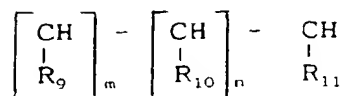
et R représente poly(hydroxyalkyle), poly[oxy(C_2-C_3)alkylène], ou un reste de saccharide, d'oligosaccharide ou de polysaccharide, éventuellement monofonctionnalisé, et leurs sels d'acide ou de bases minérales ou organiques.

12. Dérivés selon l'une des revendications 1 à 4, de formule



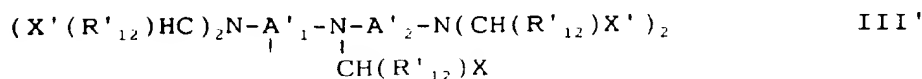
dans laquelle

- A_1 et A_2 représentent indépendamment



m et n étant 0, 1 ou 2 et leur somme valant 1 ou 2,

R₉, R₁₀, R₁₁ représentant indépendamment, H, alkyle, alkoxyalkyle, phényle, alkylènephényle, R₁₀ pouvant représenter en outre OH ou alkoxy ou l'un des R₉ et R₁₁ représente la formule



dans laquelle les lettres peuvent avoir les significations des lettres de même indice de la formule III à l'exclusion de R'₉ et R'₁₁ qui ne peuvent représenter III' et dont l'un représente (C₁-C₈)alkylène portant éventuellement un ou des alkoxy,

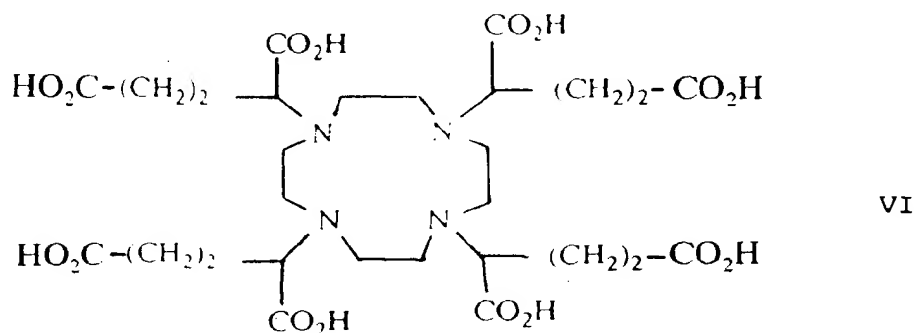
- R'₁₂ représente H, alkyle, alkoxyalkyle ou R₁,

les phényles pouvant être substitués par un ou des groupes OH, Cl, Br, I, (C₁-C₈)alkyle, (C₁-C₈)alkoxy, NO₂, NH₂, NR_xR_y, NR_xCOR_y, CONR_xR_y, COOR_x avec R_xR_y étant H ou (C₁-C₈)alkyle et les alkyle, alkylène, alkoxy étant linéaires ou ramifiés en C₁ à C₁₄ et éventuellement hydroxylés, et leurs sels avec des acides ou des bases minéraux ou organiques.

13. Dérivés de formule I dans laquelle les lettres ont les significations données à la revendication 7, à l'exclusion de 3 groupes parmi R₄, R₅, R₆, R₇ et R₈ qui représentent, au lieu de CH(R₁)X tel que défini dans les revendications 2 et 3, CH(R₂-G')X', X' représentant X éventuellement protégé et R₂ et X ayant les mêmes significations que dans les revendications 1 à 3 et G' représentant un groupe fonctionnel réactif dont COOR', SO₃R', PO₃R', NHR', SO₂NHR', N = C = S, N = C = O, OH, R' étant H ou (C₁-C₈)alkyle et leurs sels d'acides ou de bases et leurs chélates avec des cations métalliques.

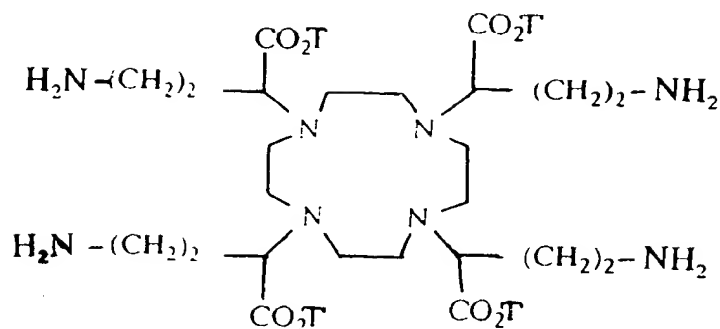
14. Dérivés de formule II dans laquelle les lettres ont les significations données à la revendication 8, à l'exclusion des groupes CH(R₁)X qui ne peuvent représenter que CH(R₂-G')-X, R₂ et X ayant les mêmes significations que dans les revendications 1 à 3 et G' représentant un groupe fonctionnel réactif dont COOR', SO₃R', PO₃R', NHR', SO₂NHR', N = C = S, N = C = O, OH, R' étant H ou (C₁-C₈)alkyle et leurs sels d'acides ou de bases et leurs chélates avec des cations métalliques.

15. Dérivé de formule



et ses chélates avec des cations métalliques et leurs sels avec des bases organiques ou minérales.

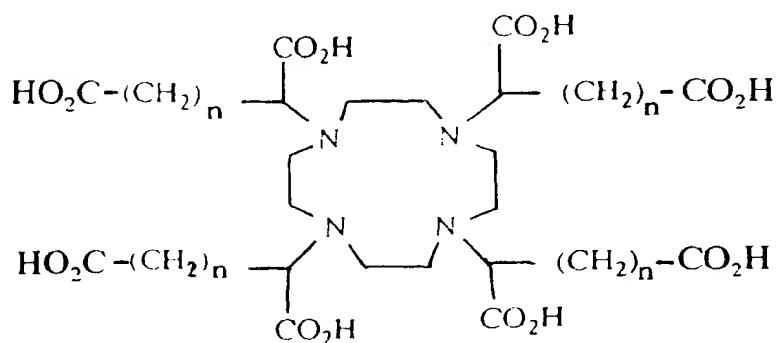
16. Dérivé de formule



VII

dans laquelle T représente H ou (C₁-C₈)alkyle et ses chélates avec des cations métalliques et leurs sels avec des acides organiques ou minéraux.

17. Chélate formé entre un ion métallique paramagnétique et un dérivé selon l'une des revendications 1 à 12.
18. Chélate selon la revendication 17, dans lequel l'ion est celui du gadolinium ou du manganèse.
19. Composition pour l'imagerie médicale par résonance magnétique nucléaire, caractérisé en ce qu'elle comprend un chélate selon l'une des revendications 17 et 18 et un véhicule physiologiquement acceptable.
20. Procédé de préparation de chélates d'un dérivé de formule IV selon la revendication 10, qui consiste à faire réagir sur le chélate du dérivé de formule



VI'

une amine de formule NR_xR_y .



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 94 40 3038

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
A	EP-A-0 565 930 (NIHON MEDI-PHYSICS CO., LTD) *Page 12-13: revendications* ---	1-20	C07D257/02 C07C229/16 A61K49/00 C07H15/26
A	WO-A-89 12631 (THE DOW CHEMICAL COMPANY) *Page 164-191: revendications* ---	1-20	
A	EP-A-0 529 645 (GANSOW, OTTO A.) *Page 12-15: revendications* ---	1-20	
A	EP-A-0 484 989 (GANSOW, OTTO A.) *Page 13-17: revendications* ---	1-20	
D,A	EP-A-0 382 583 (CELLTECH LIMITED) *Document complet* -----	1-20	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
			C07D C07C A61K C07H
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 22 Mars 1995	Examineur Luyten, H
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03.92 (P04C02)